

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>A61K 31/00, 31/14, A61B 5/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/00119</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Januar 1998 (08.01.98)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/03415 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 1. Juli 1997 (01.07.97) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 26 373.5      2. Juli 1996 (02.07.96)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser AU CA GB IE NZ SG US):</b> BOEHRINGER INGELHEIM KG [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). <b>(71) Anmelder (nur für AU CA GB IE NZ SG):</b> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; D- 55216 Ingelheim am Rhein (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WESSLER, Ignaz [DE/DE]; Würzburger Strasse 28, D-65205 Wiesbaden (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> NEW USE OF ACTIVE INGREDIENTS WHICH AFFECT NON-NEURONAL ACETYLCHOLINE FUNCTIONS <b>(54) Bezeichnung:</b> NEUARTIGE VERWENDUNG VON WIRKSTOFFEN, WELCHE DIE FUNKTIONEN VON NICHT-NEURONALEM ACETYLCHOLIN BEEINFLUSSEN <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to a process for determining the functional state of non-neuronal acetylcholine in human tissue or cells which are accessible either directly or by endoscopy. It also relates to the use of active ingredients which can affect the synthesis, release, inactivation and function of non-neuronal acetylcholine.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des Funktionszustandes von nicht-neuronalem Acetylcholin in direkt oder endoskopisch zugänglichem humanen Geweben oder Zellen sowie die Verwendung von Wirkstoffen, mit denen die Synthese, Freisetzung, Inaktivierung und die Funktion von nicht-neuronalem Acetylcholin beeinflusst werden kann.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SC	Singapur		
EE	Estland						

## **Neuartige Verwendung von Wirkstoffen, welche die Funktionen von nicht-neuronalem Acetylcholin beeinflussen**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neuartige Verwendung von Wirkstoffen, mit denen die Funktionen von nicht neuronalem Acetylcholin - z.B. epithelalem Acetylcholin - beeinflußt werden kann.

Acetylcholin wirkt als zentraler Neurotransmitter im zentralen, peripheren und enteralen Nervensystem. Demgemäß kann Acetylcholin in den entsprechenden Neuronen nachgewiesen werden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Acetylcholin nicht nur in Neuronen als Neurotransmitter eine zentrale Aufgabe erfüllt, sondern, daß sogenanntes nicht-neuronaless Acetylcholin im humanen Oberflächenepithel eine wichtige Rolle spielt und dort durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) synthetisiert wird.

So kann nicht-neuronaless Acetylcholin beispielsweise in dem Oberflächenepithel humaner Atemwege, des Magen-Darm-Traktes - wie Dünndarm, Colon, Sigma und Gallenblase - in der vaginalen Schleimhaut, in der Epidermis der menschlichen Haut und auch in vielen anderen Zellen nachgewiesen werden.

Die - überraschenderweise - weite Verbreitung von Acetylcholin im menschlichen Epithel konnte dabei in mehrfacher Weise mittels experimentell unterschiedlicher Ansätze nachgewiesen werden: z.B.

- Nachweis der Gegenwart des ChAT-Proteins auf dem Wege der Immunohistochemie und Western Blot unter Verwendung von poly- und monoklonalen Anti-ChAT-Antikörpern;

**BESTÄTIGUNGSKOPIE**

- Nachweis der ChAT-Ezymaktivität in isolierten Epithel-Zellen - und
- Nachweis von Acetylcholin in Epithel-Zellen mittels HPLC-Analyse.

Der Nachweis von nicht-neuronalen Acetylcholin kann durch einfaches "Abwischen" der entsprechenden Oberflächen mit einem Wattestäbchen erfolgen. Das dabei von der Watte aufgenommene Zellmaterial enthält soviel Acetylcholin, daß es für einen analytischen Nachweis ausreicht. Bei dieser Methode der Probennahme wird beispielsweise weder die Basalmembran-(Bronchien) noch die Lamina muscularis mucosae (Intestinum) beschädigt, wodurch eine Kontamination der aus der Watte gewonnenen Extrakte mit cholinergen Neuronen ausgeschlossen ist. Daneben ist aus dem Stand der Technik bekannt, daß das Oberflächenepithel humaner Atemwege - ebenso wie die humane Epidermis - nicht durch cholinerge Neuronen innerviert wird.

Neben anderen überzeugenden Nachweisen liefert die sogenannte Western Blot-Analyse einen eindrucksvollen Beweis für die Anwesenheit von ChAT-Proteinen in den erwähnten Epithelzellen. So konnten u.a. aus humanen Bronchial-Epithelzellen ChAT-Proteine mit Molekulargewichten von ca. 45 und 51 kD extrahiert werden.

Im Intestinum konnte eine starke ChAT-entsprechende Immunoreaktivität in Epithelzellen nachgewiesen werden. Diese immunpositiven Enterozyten verkörpern Brush-Border-Zellen, die Microvilli aufweisen, und die in das Absorptions- und Sekretionsgeschehen eingebunden sind.

Epitheliales Acetylcholin konnte überraschenderweise entlang des gesamten Intestinaltraktes - beginnend in der Mundschleimhaut bis zum Dünn- und Dickdarm sowie in der Gallenblase - nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Atemwege, wobei Acetylcholin in großen wie auch in kleinen Bronchien nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde epidermales Acetylcholin im Bereich der nahezu gesamten Körperoberfläche gefunden (obere und untere Extremitäten, Thorax, Bauch und Rücken). Eine besonders ausgeprägte ChAT-entsprechende Immunoreaktivität wurde in der Wachstumszone der Haare, den Haarfollikeln, gefunden. Daneben konnte Acetylcholin auch direkt in den humanen Körperhaaren nachgewiesen werden. Weiterhin wurde Acetylcholin auch in Epithelzellen der harnableitenden

Wege nachgewiesen, wie auch in Mesothelzellen (Pleura, Perikard) sowie in bestimmten Immunzellen (alveoläre Makrophagen, mononukleäre Zellen) und in glialen Zellen.

In diesem Zusammenhang sei auf die Wirkungen von Acetylcholin auf die Funktion von Epithel-/Epidermiszellen und in anderen Zellen nachgewiesen werden.

1. Proliferationsteigerung, Zelldifferenzierung, Regulation des Zellzyklus;
2. Regulation der Zell-Zellkommunikation mit Beeinflussung der Funktion von "tight-junctions", "gap-junctions" und Desmosomen;
3. Kontrolle von Immunfunktionen von Schleimhäuten und der Haut;
4. Steigerung der Zilientätigkeit;
5. Regulation der Chloridsekretion;
6. Sekretion von Phospholipiden;
7. Regulation der Resorption (z. B. Cholin);
8. Regulation von Zell-Lokomotion;
9. Trophische Funktionen.

In der Tat konnte der experimentelle Beweis erbracht werden, daß nicht-neuronales Acetylcholin wichtige Funktionen von nicht-neuronalen Zellen (Epithelzellen) reguliert: Zell-Zellkontakt, Barriere-Funktion, Lymphdrainage, Proliferation. Diese neuen Erkenntnisse ermöglichen es, bei Krankheitszuständen, die mit einer Verstellung des nicht-neuronalen Acetylcholinsystems einhergehen, die erfindungsgemäßen Maßnahmen anzuwenden.

Demzufolge kann mit Substanzen, die eine Wirkung auf die Funktion von nicht-neuronalem Acetylcholin entfalten können, auch ein positiver therapeutischer Effekt bezüglich Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und der Haut, die in Zusammenhang mit einer gestörten Funktion von nicht-neuronalem Acetylcholin stehen, erzielt werden.

So eröffnet beispielsweise die vorliegende Erfindung die Möglichkeit, die wässrige Diarrhoe - wie sie z.B. bei der Cholera beobachtet wird - mit topisch wirkenden Antagonisten an Muskarinrezeptoren (nicht-selektive und M1-selektive Antagonisten) therapieren zu können. Daneben wird die Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen - wie z.B. der Colitis ulzerosa - mit topisch wirksamen Agonisten an Muskarin-/Nikotinrezeptoren ermöglicht, da bei diesem Krankheitsbild die Barrierefunktion der Schleimhaut gestört ist.

Bezüglich der Atemwegserkrankungen kann erfindungsgemäß die zystische Fibrose mit topisch wirkenden Agonisten an Muskarinrezeptoren, mit nicht-selektiven oder M1-selektiven Agonisten oder topisch-wirksamen Hemmstoffen der Cholinesterase ermöglicht werden.

Erfindungsgemäß wird auch eine Therapiemöglichkeit der Hypersensitivität (Asthma bronchiale) mit topisch wirkenden Antagonisten an Muskarinrezeptoren (nicht subtypenselektiven M1-Rezeptoren) eröffnet.

Letztendlich erschließt die vorliegende Erfindung bei Hauterkrankungen - wie zum Beispiel von Wundheilungsstörungen mit - Medikamenten, die eine stimulierende Wirkung auf die Funktion des epidermalen cholinergen Systems ausüben - wie z.B. Agonisten an Muskarin- oder Nikotinrezeptoren, Hemmstoffen der Cholinesterase, Aktivatoren des epidermalen Acetylcholins, Aktivatoren für die Freisetzung und Verstärkung bezüglich der Expression des synthetisierenden Enzyms ChAT - den Zugang zu einem positiven therapeutischen Effekt .

Daneben ermöglicht die vorliegende Erfindung durch die Verwendung von Aktivatoren der Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) in nicht-neuronalen Zellen (Gliazellen ) die Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit. So konnte in Primärkulturen von Ratten-Gliazellen  $2 \pm 0.7$  pmol pro  $10^6$  Zellen Acetylcholin nachgewiesen werden.

Auf der anderen Seite wird erfindungsgemäß eine erfolgreiche Behandlung - beispielsweise der atopischen Dermatitis, der Neurodermatitis, der Psoriasis und z.B. der cholinergen Urticaria - mit Wirkstoffen, die eine hemmende Wirkung auf die Funktion von epidermalen Acetylcholin ausüben - wie z.B. Antagonisten an Muskarin- bzw. Nikotinrezeptoren, Hemmstoffen der Cholin-Acetyltransferase, Hemmern der epidermalen Acetylcholin-Freisetzung und Reduktoren bezüglich der Expression des synthetisierenden Enzyms Cholin-Acetyltransferase - erzielt.

Dabei eignen sich als topisch wirkende Agonisten zur Behandlung von Atemwegserkrankungen beispielsweise Wirkstoffe wie sie in der Deutschen Offenlegungsschrift DE-OS 38 39 385 offenbart sind - insbesondere Wal 2014. Daneben kommen z.B. Verbindungen wie Carbachol oder Acetylcholin selbst in Frage.

Daneben kommt als nikotinischer Antagonisten beispielsweise DMPP (Dimethyl-4-phenylpiperazinium) in Frage.

Als - u.a. topisch wirksame - Hemmstoffe der Cholinesterase seien neben Tacrine und Physostigmin beispielsweise Verbindungen wie sie in der Europäischen Offenlegungsschrift EP-A-0 296 650 - insbesondere Donepezil und seine Säureadditionssalze oder Wirkstoffe, wie sie in der Deutschen Offenlegungsschrift DE-OS 38 05 744 - insbesondere SDZ-ENA-713 - offenbart sind, genannt.

Als - u.a. - topisch wirkende Antagonisten an Muskarinrezeptoren seien beispielsweise - neben Wirkstoffen wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind sind - Atrovent, Propantelin, Buscopan, Alginor, Oxivent, Scopolamin und Atropin genannt und Verbindungen, wie sie aus der Deutschen Offenlegungsschrift 39 31 041 bekannt sind - insbesondere BA 679, BEA 2108 (Bromid des endo-3-[(Hydroxy-di-2-thienylacetyl)oxy]-8,8-dimethyl-8-azonia-bicyclo[3.2.1]oct-6-ens) und BA 253 genannt.

In Hinblick auf topisch wirksame Antagonisten an Muskarin- oder Nikotinrezeptoren zur Behandlung von Hauterkrankungen sei in erster Linie auf nikotinische Blocker, wie z.B. Tubocurarin, Alcuronium, Galamin und Decamethonium und Pancuronium verwiesen.

wie z.B. Tubocurarin, Alcuronium, Galamin und Decamethonium und Pancuronium verwiesen.

Die beschriebene Erfindung wird nunmehr durch die folgenden Beispiele erläutert. Verschiedenartige, andere Ausgestaltungen werden für den Fachmann aus der vorliegenden Beschreibung ersichtlich. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Beispiele und die Beschreibung lediglich zur Erläuterung vorgesehen und nicht als Einschränkung der Erfindung anzusehen sind.

Zur Bestimmung des Funktionszustandes von nicht-neuronalem Acetylcholin in direkt oder endoskopisch zugänglichem humanen Geweben oder Zellen ist vorab zu bemerken, daß diese im allgemeinen dadurch erfolgen kann, daß man aus diesen Geweben eine Probe nimmt und in dieser Probe auf an sich bekannte Weise den Gehalt an Acetylcholin bestimmt.

Dabei kann die Probennahme beispielsweise durch Wischen der Oberfläche mit einem Wattestäbchen erfolgen. Daneben kann - beispielsweise zur Bestimmung der Funktion von epitheliale Acetylcholin innerhalb des Respirations, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts - die Probennahme in der Weise erfolgen, daß man die Probe mit einer - ggf. mit einer Testflüssigkeit - angefeuchteten Watterolle gewinnt.

Des weiteren kann zur Bestimmung des Acetylcholins aus der Haut, der Mundschleimhaut und der vaginalen Schleimhaut die sog. "Cup"-Technik angewandt werden. Dazu wird ein zur Probennahme geeignetes und mit einer das Acetylcholin aufnehmenden Flüssigkeit beschicktes Gefäß so auf die Haut aufgesetzt, daß das Acetylcholin in die Vorrichtung hinein diffundieren kann.

Daneben können zur Bestimmung der Funktionalität von nicht-neuronalem Acetylcholin Stimulationslösungen eingesetzt werden, die aus dem Stand der Technik bekannt sind - wie z.B. Lösungen von Nikotin, Zitronensäure oder  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten.



## Beispiele

### Methoden

#### Separierung der Epithel-Zellen

Humanes Gewebe (Bronchien, Intestinalgewebe) wurde von Operationsmaterial gewonnen, das im Rahmen der Tumor- und Steinchirurgie anfiel.

Kleine Stücke humaner Haut (10 bis 50 mg) wurden ebenfalls aus Operationsmaterial gewonnen. Dabei wurde ausschließlich nur - makroskopisch - tumorfreies Gewebe analysiert. Humane Bronchien (bis zu einem Durchmesser von 4 mm) oder Intestinalgewebe (Magen, Dünndarm und Dickdarm sowie Gallenblase) wurden vorsichtig unmittelbar nach der Dissektion von anhängenden Gewebeteilen befreit und auf dem Wege vom Krankenhaus zum Labor in einer oxygenierten Salzlösung (Zusammensetzung in mMol = 125 NaCl, 23.8 NaHCO<sub>3</sub>, 5.05 Glukose, 2.68 KCl, 1.80 CaCl<sub>2</sub>, 0.539 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0567 Ascorbinsäure und 0.001 Cholinchlorid) aufbewahrt.

Die Acetylcholin- und ChAT-Aktivität wurde an mechanisch oder enzymatisch isolierten Epithelzellen bestimmt. Zur mechanischen Isolierung wurde die luminalen Oberfläche des jeweiligen Gewebes vorsichtig mit einem Wattestäbchen (Q-Tip) abgestrichen.

Zum Beispiel wurden humane Bronchien oder Jejunum in einer Petrischale mit der luminalen Seite nach oben fixiert. Mit einem Wattestäbchen wurde die luminalen Oberfläche abgestrichen (Wischzeit ca. 5 Sekunden), wobei das Wattestäbchen in keinem Fall die epitheliale Oberfläche bis zur Basalmembran durchdrang, d.h. die darunterliegende Lamina propria blieb unbeschädigt. Dies wurde histologisch mehrfach überprüft.

In gleicher Weise wurde die epitheliale Oberfläche von intestinalen Gewebe untersucht, wobei strikt darauf geachtet wurde, daß die Lamina muscularis mucosa mit dem darunterliegenden cholinergen, submucosalen, Plexus unversehrt blieb. Auch hierzu erfolgte eine histologische Überprüfung.

In analoger Weise wurden Proben von der epithelialen Oberfläche der Mundschleimhaut bzw. der vaginalen Schleimhaut genommen.

Nach dem Abwischen wurden die Wattestäbchen mit 1 ml einer Vol.-15 %igen Ameisensäurelösung in Aceton extrahiert. Aus diesem Extrakt erfolgte dann der Nachweis des Acetylcholins.

Epitheliale Zellen der humanen Bronchien und des Dünndarms wurden auf enzymatischem Wege isoliert - durch Inkubation (2h bei 36°C oder 24 h bei 4°C) mit 0,1%-iger Pronase in einem DMEM/F12-Medium zwecks Isolierung der Epithelzellen und nachfolgender Messung der Enzymaktivität bzw. zur "Western-Blot-Analyse" behandelt. Isolierte Epithelzellen wurden durch Färbung mit einem Antikörper gegen Pan-Zytokeratin auf ihren epithelialen Ursprung hin überprüft.

#### Messung des endogenen Acetylcholins

Die Bestimmung des Acetylcholingehalts erfolgte in Wattestäbchen-Extrakten von Oberflächenepithelien und in homogenisierter humaner Haut. Die Haut wurde in 1 ml einer 15-Vol.-%igen Lösung von Ameisensäure in Aceton gegeben und mit einem Messer zerkleinert.

Nach dem 30-minütigen Aufbewahren auf Eis wurde das Extraktionsmedium zentrifugiert (10 min. 4000 Upm) und der Überstand wurde bis zur Trockne im Stickstoffstrom eingeeengt. Das Sediment der getrockneten Probe wurde in 300 - 500 µl der mobilen Phase für die HPLC-Analyse resuspendiert. Ein Volumen von 20 µl wurde injiziert, wobei das Acetylcholin durch Kationen-Austausch-HPLC mittels elektrochemischer Detektion bestimmt wurde; dazu wurde das "BAS 481 Microbore System" benutzt. Cholin und Acetylcholin wurden an einer Sep Stik-Säule (1 x 530 mm) mit einer mobilen Phase eines 40 mM Phosphat Puffers und 0.3 mM EDTA (eingestellt auf pH 8.5) chromatographiert.

Der analytischen Säule folgte eine Reaktionsstufe mit einem immobilisierten Enzym (Sep Stik IMER 2/pkg), in der das Acetylcholin hydrolisiert wurde. Durch die anschließende Umsetzung mit Cholinoxidase wurde Wasserstoffperoxid gebildet, welches eine Platin-Elektrode umspülte (Referenzelektrode Ag/AgCl, 0,5 V). Der dadurch entstehende Strom verhält sich proportional zur Menge des gebildeten Acetylcholins [Reinheimer, T., P. Bernedo, H. Klapproth, H. Oelert, B. Zeiske, K. Racké, and I. Wessler, 1996. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea-pig, and human: species differences in the role of airway mucosa, Am. J. Physiol. 14, L722-728], wobei die Nachweisgrenze für Acetylcholin bei 10 fmol pro 20 µl Injektionsvolumen liegt [Ricny J., K.-D. Höhle, K. Racké and I. Wessler, 1995. Effect of inhaled steroids on cholinergic transmission in human isolated bronchi. Eur. Respir. J. 8: 587-589]. Um eine Kontamination während des Extraktionsverfahrens ausschließen zu können, wurden Wattestäbchen, die nicht mit humanem Gewebe in Kontakt gekommen waren, unter analogen Bedingungen extrahiert. Die so gewonnenen Extrakte lieferten kein Signal für Acetylcholin.

#### Immunohistochemie und "Western Blot-Analyse"

Das ChAT-Protein konnte auf immunohistochemischem Weg und durch "Western Blot-Analyse" durch Verwendung eines polyclonalen Anti-ChAT-Antikörpers nachgewiesen werden [Schemann, M., H. Sann, C. Schaaf, and M. Mäder, 1993, Identification of cholinergic neurons in enteric nerves by antibodies against choline acetyltransferase, Am. J. Physiol. 265, G1005-G1009]. Weiterhin wurde auch ein monoklonaler Anti-ChAT-Antikörper eingesetzt.

Zur Durchführung der Immunhistochemie wurde tumorfreies, humanes Gewebe (Bronchien, Dünndarm und Magen, Haut) unmittelbar nach der operativen Isolierung mit Isopentan blitzgefroren und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Gefrorene Schnitte (4 µm) wurden - jeweils über einen Zeitraum von 15 min. - mit 4 %-iger Formaldehydlösung und durch Inkubierung mit 0.1 %-iger Triton X-100 Lösung permeabilisiert.

Zur Detektion des ChAT-Antigens wurden primäre Antikörper und anschließend sekundäre Antikörper-Konjugate eingesetzt.

Für die "Western-Blot- Analyse" wurden auf enzymatischem Wege isolierte Epithelzellen bzw. - zum Vergleich - homogenisiertes Rattenhirn lysiert und die Proteine des Cytosols wurden mittels Ultrazentrifugation extrahiert. 100 µg des Proteins wurden separiert (SDS-PAGE) und auf Nitrocellulose aufgebracht.

Die Visualisierung erfolgte mittels des anti-ChAT-Antikörpers und dem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper-Phosphatase-Konjugat.

#### Messung der ChAT-Aktivität

Die Bestimmung der ChAT-Enzym-Aktivität wurde in Extrakten der Wattestäbchen von Abstrichen der Darmsurface oder in Extrakten von enzymatisch isolierten Epithel-Zellen (aus humanen Bronchien und Dünndarm) oder auch von Extrakten humaner Haut vorgenommen.

Der ChAT-Assay wurde nach Methoden durchgeführt, die aus dem Stand der Technik bekannt sind [Reinheimer, T., P. Bernedo, H. Klapproth, H. Oelert, B. Zeiske, K. Racké, and I. Wessler, 1966. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea-pig, and human: species differences in the role of airway mucosa, *Am. J. Physiol.* In press und Ricny J., K.-D. Höhle, K. Racké and I. Wessler, 1995: Effect of inhaled steroids on cholinergic transmission in human isolated bronchi. *Eur. Respir. J.* 8: 587-589].

Enzymatisch isolierte Epithelzellen wurden aus einem DMEM/F12-Medium durch vorsichtige Zentrifugation (5 min, 200 Upm) und nachfolgendem dreimaligem Waschen der so erhaltenen Pellets mit jeweils 3 ml phosphat-gepufferter Salzlösung vorbereitet. Das Zell-Pellet bzw. Wattestäbchen wurden mit 0,5 ml Extraktionspuffer in Kontakt gebracht (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100). Nach 15-minütiger Eiskühlung wurden die Proben zentrifugiert (3 min; 12 000 Upm; 0°C). Ein Aliquot (20 µl) der überstehenden Lösung wurde einem Puffer zugegeben, der 8 mM Cholinchlorid, 0.1 mM Physostigmin und 0.2 mM [<sup>3</sup>H] AcCoA enthielt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 30 Minuten gestoppt und das synthetisierte [<sup>3</sup>H]Acetylcholin wurde mittels Ionenpaar-Extraktion

isoliert und der Tritium-Gehalt wurde mit Hilfe der Flüssigkeits-Scintillationsspektrometrie bestimmt, [Rigny J., K.-D. Höhle, K. Racké and I. Wessler, 1995. Effect of inhaled steroids on cholinergic transmission in human isolated bronchi. Eur. Respir. J. 8: 587-589]. Um die spezifische ChAT-Aktivität bestimmen zu können, wurde der selektive Inhibitor Bromacetylcholin zum Assay-Puffer zugefügt. Der Protein-Gehalt wurde gemäß Smith et al. [Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85] bestimmt.

### Ergebnisse

#### Endogenes Acetylcholin in humanen Epithelzellen

Die Epithelzellen wurden durch leichtes Abreiben der luminalen Oberfläche isolierter Bronchien mit einem Wattestäbchen gewonnen, ohne dabei die Basalmembran zu durchdringen. In den Extrakten der an der Oberfläche befindlichen Epithelzellenschicht konnten so signifikante Mengen Acetylcholin ( $33 \pm 10$  pmol/g Bronchien ( $n = 15$ )) mittels HPLC-EC nachgewiesen werden. Dabei konnte die Spezifität des Peaks, der in dem Chromatogramm dem Acetylcholin zugeordnet wurde, mehrfach gesichert werden.

Der Nachweis von Acetylcholin in Epithelzellen humaner Atemwege weist darauf hin, daß wichtige epitheliale Funktionen durch nicht-neurales Acetylcholin reguliert werden (Sekretion, mukoziliäre Clearance, Barrierefunktion, Zellproliferation).

Dieser überraschende Effekt eröffnet somit eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Atemwegserkrankungen - wie z.B. der zystischen Fibrose -, mit topisch wirkenden Agonisten an Muskarinrezeptoren (nicht-selektive oder M1-selektive Agonisten) oder topisch wirksamen Hemmstoffen oder Cholinesterinase oder des Asthma bronchiale mit Antagonisten an Muskarinrezeptoren (nicht-subtypenselektive oder selektiven M1-Rezeptoren).

Auf vergleichbare Weise konnten humane Epithelzellen aus dem Intestinaltrakt gewonnen werden. Dabei wurden tumorfreie Segmente des Magens der Jejunums des Ileums, des Colons und des Sigmas von Patienten mit Tumoren im Intestinalbereich untersucht. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Präparate belegen, daß nach dem Abreiben der luminalen Oberfläche lediglich einige Villi entfernt wurden, wohingegen die Lamina muscularis mucosa mit dem darunterliegenden submucosalen cholinergen Plexus vollkommen intakt geblieben waren.

Die Extrakte aus Epithelzellen des humanen Dünndarms enthielten etwa 1 nmol/g Jejunum. Dagegen konnte deutlich weniger Acetylcholin in den entsprechenden epithelialen Extrakten des Colons oder des Sigmas (1 - 50 pmol/g) nachgewiesen werden. In den entsprechenden Extrakten von Epithelzellen der Magenschleimhaut (pylorischer Teil) konnte dagegen kein epitheliales Acetylcholin nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite wurden signifikante Mengen von Acetylcholin in epithelialen Extrakten der Gallenblase ( $12 \pm 5$  pmol/g,  $n = 5$ ) nachgewiesen.

Dieser unerwartete Nachweis von epithelalem Acetylcholin im Darmtrakt und die beobachteten zellulären Wirkungen von Acetylcholin erschließt einen neuen Therapieweg zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes - wie zum Beispiel der Colitis ulzerosa - mit topisch wirksamen Agonisten an Muskarin/Nikotinrezeptoren - oder der wässerigen Diarrhoe, wie sie beispielsweise bei der Cholera beobachtet wird - mit topisch wirkenden Antagonisten an Muskarinrezeptoren (nicht selektiver und M1-selektiver Art) behandeln zu können.

Zusätzlich zu den schon erwähnten Epithelzellen der Atemwege und des Intestinums konnte Acetylcholin in den Epithelzellen der Mundschleimhaut und der Mucosa der Vagina nachgewiesen werden. So wiesen die Epithelzellen männlicher Erwachsener  $8 \pm 2$  pmol ( $n=5$ ) Acetylcholin pro Extrakt auf. Der Acetylcholingehalt der Epithelzellen von Schleimhäuten vaginaler Herkunft lag bei  $6 \pm 2$  pmol Acetylcholin ( $n = 4$ ).

Dazu ergänzend konnten in Schnitten humaner Haut (Epidermis/Dermis) signifikante Mengen an Acetylcholin nachgewiesen werden ( $1000 \pm 300$  pmol/g,  $n = 7$ ). Der Acetylcholingehalt der humanen Kopfhare betrug  $1,5 \pm 0,2$  nmol/g ( $n = 3$ ). In allen

Fällen konnte die Spezifität des Acetylcholinpeaks von allen genannten Proben im Rahmen der HPCL gesichert werden.

Der Nachweis von epidermalem Acetylcholin und die beobachteten zellulären Wirkungen erschließt erfindungsgemäß einen neuen Zugang zur Behandlung von Hauterkrankungen - wie beispielsweise von Wundheilungsstörungen - mit pharmazeutischen Wirkstoffen, die eine stimulierende Wirkung auf die Funktion des epidermalen, cholinergen Systems ausüben - wie z.B. Agonisten an Muskarin- oder Nikotinrezeptoren, Hemmstoffe der Cholinesterase, Aktivatoren des epidermalen Acetylcholins, Aktivatoren für die Freisetzung und Verstärkung bezüglich der Expression des synthetisierenden Enzyms Cholin-Acetyltransferase. Gleiches gilt auch für Störungen des Haarwuchses bzw. Haarausfall:

Untersuchungen von Hautbiopsien von Patienten mit Neurodermitis bzw. Psoriasis belegen eine deutliche Verstellung des epithelialen cholinergen Systems. - So lag der Gehalt von epidermalen Acetylcholin in 4 mm Hautstanzen bei  $156 \pm 33$  pmol pro Gramm Trockengewicht ( $n=14$ ). Bei Patienten mit Neurodermitis wurde ein Gehalt von  $1900 \pm 670$  pmol pro Gramm Trockengewicht gefunden ( $n=7$ ,  $p<0.01$ ) und bei Patienten mit Psoriasis vulgaris lag der Gehalt bei  $630 \pm 210$  pmol pro Gramm Trockengewicht ( $n=8$ ). Diese ausgeprägte Veränderungen legen eine pathophysiologische Bedeutung des epidermalen Systems bei den geschilderten Erkrankungen nahe.

Auffälligerweise bestand bei den Patienten mit Neurodermitis auch im Bereich der Mundschleimhaut eine Hochregulation von epithelialen Acetylcholin. Durch eine 1 %-ige Lösung von Zitronensäure in Wasser lassen sich aus der Mundschleimhaut innerhalb einer Minute aus einer definierten Oberfläche  $1.6 \pm 0.6$  pmol/ml ( $n=9$ ) Acetylcholin freisetzen, während bei Patienten mit Neurodermatitis  $4.0 \pm 0.9$  pmol/ml ( $n=11$ ;  $p<0.05$ ) Acetylcholin gefunden wurde. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß bei allergisch-entzündlichen Erkrankungen epitheliales Acetylcholin hochreguliert ist.

Als weitere Bestätigung dieser Schlußfolgerung wurde gefunden, daß bei Meerschweinchen, die einem klassischen inhalativen Sensibilisierungsprotokoll zugeführt wurden, das epitheliale Acetylcholin in der Trachea erhöht war.

Weiterhin ermöglichen die beschriebenen unerwarteten Befunde einen neuen Ansatz zur erfolgreichen Behandlung von Erkrankungen der Haut - wie z.B. der atopischen Dermatitis, der Neurodermatitis, der Psoriasis und der cholinergen Urticaria - mit Wirkstoffen, die eine hemmende Wirkung auf die Funktion von epidermalen Acetylcholin ausüben können - wie z.B. Antagonisten an Muskarin- bzw. Nikotinrezeptoren, Hemmstoffen der Cholin-Acetyltransferase, Hemmern der epidermalen Acetylcholin-Freisetzung sowie Inhibitoren bezüglich der Expression des synthetisierenden Enzyms Cholin-Acetyltransferase.

#### Immunohistochemie bezüglich des ChAT-Proteins

In weiterführenden Experimenten konnte die Frage geklärt werden, ob das für die Synthese des Acetylcholins verantwortliche Enzym ChAT in den epithelialen Zellen auf den Oberflächen der Bronchien und des Intestinums expremiert wird. In der Tat konnte eine spezifische und intensive ChAT-Immunoreaktivität im Oberflächen-epithel humaner Bronchien - insbesondere in zilientragenden Zellen - und in weitaus höherem Ausmaß im humanen Dünndarm nachgewiesen werden - dagegen nicht in der Mucosa des pylorischen Teils des menschlichen Magens. Eine spezifische ChAT-analoge Immunoreaktivität konnte ebenso in Epithelzellen des menschlichen Colons und der Gallenblase und in humaner Haut - insbesondere in Basalzellen - nachgewiesen werden.

Die Expression des ChAT-Proteins konnte sowohl mit einem poly- als auch mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Eine positive ChAT-Immunoaktivität wurde ebenso in Mesothelzellen - (z.B. Pleura, Perikard) - nachgewiesen.



### "Western-Blot-Analyse" bezüglich des ChAT-Proteins in epithelialen Zellen humaner Bronchien

Die "Western-Blot-Analyse" des Proteins, das auf enzymatischem Wege aus Epithelzellen von humanen Bronchien isoliert wurde, lieferte einen weiteren Beleg für die Anwesenheit des ChAT-Proteins. Zum Vergleich wurde ein Homogenisat aus Rattenhirn ebenfalls untersucht.

In der Probe aus dem Hirn der Ratte entspricht die prominente Bande dem bisher schon bekannten 68 kd "neuronalen" ChAT-Protein; dagegen werden in Epithelzellen bronchialen Ursprungs ChAT-Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht von 41 und 54 kd aufgefunden.

### ChAT-Enzymaktivität in Epithelzellen

Einen weiteren Beweis lieferte die direkte Messung der ChAT-Enzymaktivität in den Extrakten des intestinalen Epithels, die mittels Wattestäbchen gewonnen wurden oder in Extrakten, die auf enzymatischem Wege aus Epithelzellen gewonnen wurden.

ChAT-Aktivitäten von  $3.5 \pm 1.3$  ( $n = 5$ ) und  $28 \pm 11$  ( $n = 5$ ) nmol/mg Protein/h wurden in einem so isolierten Material aus humanen Bronchien sowie Dünndarm ermittelt. ChAT-Enzymaktivität ließ sich auch in 24 h lang kultivierten Epithelzellen nachweisen.

Bromacetylcholin (30  $\mu$ M), welches einen spezifischen ChAT-Inhibitor darstellt, reduzierte die Enzymaktivität um 80 - 90 %.

### Untersuchungen zur Funktion von nicht-neuronalem Acetylcholin

#### Untersuchungen an humaner Haut

Kleine (1 x 0,4 cm) Hautstücke wurden aus frischem Operationsmaterial gewonnen und in eine oxygenierte Nährlösung gegeben. Die Nährlösung enthielt entweder den

Zusatz von 1  $\mu$ M Atropin (Blockade von Muskarinrezeptoren) oder 30  $\mu$ M Tubocurarin (Blockade von Nikotinrezeptoren); die Kontrolle wurde ohne Zusatz eines Medikamentes durchgeführt. Nach 30 min und 2,5 Stunden wurden Hautstücke aus dem Medium entnommen und nach dem Stand der Technik zur Elektronenmikroskopie aufgearbeitet.

Dabei zeigte sich, daß die Behandlung mit Atropin nach 30 min zu einer Erweiterung des Zwischenzellraums, zu einer Auflockerung von Keratinfilamenten und Desmosomen geführt hat. Der Zwischenraum wurde morphometrisch ausgemessen (NIH-Image-Programm). Der mittlere Abstand zwischen zwei benachbarten Zellen betrug in der Kontrolle  $0,781 \pm 0,06 \mu\text{m}$  (Auszählung von 20 Grenzflächen), nach Atropin-Behandlung  $1,06 \pm 0,006 \mu\text{m}$  (Auszählung von 20 Grenzflächen;  $p < 0.01$ ) und nach Tubocurarin  $0,756 \pm 0,035 \mu\text{m}$  (Auszählung von 16 Grenzflächen). Nach 2,5 Stunden Einwirkzeit hatte sich auch nach Behandlung mit Tubocurarin eine Erweiterung eingestellt (Kontrolle:  $0,728 \pm 0,037 \mu\text{m}$ , Auszählung von 20 Grenzflächen; Tubocurarin:  $0,926 \pm 0,118 \mu\text{m}$ , Auszählung von 20 Grenzflächen,  $p < 0,001$ ).

#### Untersuchungen an humanem Dünndarm

Dünndarmstücke wurden aus frischem Operationsmaterial erhalten und in ähnlicher Weise wie für Haut beschrieben in oxygenierter Nährlösung inkubiert. Anstelle einer elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde eine Lichtmikroskopie nach vorheriger HE-Färbung vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß Atropin im Vergleich zur Kontrolle nach 30 minütiger Einwirkzeit eine deutliche Erweiterung kleiner Lymphgefäße und ein Lymphödem im Zottenstroma herbeiführte. Es ist bekannt, daß eine intakte Funktion von "gap-junction" für die geordnete kontraktile Aktivität kleiner Lymphgefäße notwendig ist (Zawieja et al., Am J. Physiol 264, H1283-91, 1993). Durch Blockade von Muskarinrezeptoren, d.h. durch Ausschaltung der Funktion von Acetylcholin wurde eine Störung des Lymphflusses ausgelöst.

### Untersuchungen an kultivierten Epithelzellen humaner Bronchien

Aus frischem Operationsmaterial wurden Bronchien isoliert und nach dem Stand der Technik Epithelzellen gewonnen (Reinheimer et al., Am J. Physiol 270, L 722-8, 1996). Zur Messung der Zellproliferation wurde ein standardisiertes Meßverfahren, die MTT-Methode, eingesetzt (Bagge et al., J Immunol Meth 119, 203-10, 1989). Dabei zeigte sich, daß zugesetztes Acetylcholin eine konzentrationsabhängige Steigerung der Zellproliferation (0.1 nM - 10 µM ) auslöste, während Bromacetylcholin, ein Hemmstoff der Acetylcholinsynthese, das Gegenteil herbeiführt. Antagonisten an Nikotin- und Muskarinrezeptoren führen zu einer antiproliferativen Wirkung. Diese Befunde zeigen, daß nicht-neuronaes Acetylcholin an der Regulation der Zellproliferativen beteiligt ist.

Als weitere Methode zur Messung der Zellproliferation wurde der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau angewandt. Auch dabei zeigte sich, daß Acetylcholin eine proliferationssteigernde Wirkung vermittelt, während Synthesehemmer die Nitroserate reduzieren.

### Untersuchung von Immunzellen

Acetylcholin und ChAT-Enzymaktivität wurde in isolierten humanen mononukleären Zellen ( $0.4 \pm 0.07$  pmol /  $10^6$  Zellen; n=6) und in humanen alveolären Makrophagen gefunden.

Zur Wechselwirkung zwischen den cholinergen System und Immunzellen konnte nachgewiesen werden, daß exogenes und endogenes Acetylcholin die Aktivierbarkeit von mukosalen Mastzellen in humanen Bronchien hemmt. Diese inhibierende Kontrollfunktion erfolgt jedoch in einem engen Konzentrationsfenster; unter den Bedingungen eines hochregulierten cholinergen Systems kann die Funktionskontrolle verlorengehen. Daraus erwächst eine proinflammatorische Wirkung. Diese kann durch eine stimulatorische Wirkung von Acetylcholin auf die Synthese und Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins GM-CSF von humanen bronchialen Epithelzellen verstärkt werden. Exogen appliziertes Acetylcholin steigert die GM-CSF-Freisetzung aus Primärkulturen humaner

bronchialer Epithelzellen um das zwei- bis dreifache. In einem Versuch an isolierten humanen Makrophagen wurde gefunden, daß nach der Blockade von Nikotin- und Muskarinrezeptoren eine explosionsartige Migration mit einhergehender Lyse der Zellen auftrat.

Dies bedeutet, daß nicht-neuronaies Acetylcholin an der Kontrolle der Migration und Phagozytose von Makrophagen beteiligt ist.

Ergänzend wird auf die Offenbarung der Deutschen Patentanmeldung Nr. 196 26 373.5, deren Priorität diese Anmeldung in Anspruch nimmt, vollinhaltlich Bezug genommen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines topisch wirkenden pharmazeutischen Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheitszuständen im Bereich der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes, die durch das Einwirken von nicht-neuronalem Acetylcholin hervorgerufen werden.
2. Verfahren zur Behandlung von Krankheitszuständen der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes eines Individuums, die durch das Einwirken von nicht-neuronalem Acetylcholin hervorgerufen werden, dadurch gekennzeichnet, daß dem Individuum topisch eine pharmazeutisch aktive Substanz in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis verabreicht wird.
3. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 zur Behandlung der Unterfunktion von nicht-neuronalem Acetylcholin im Bereich der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Agonist an Muskarin/Nikotinrezeptoren, ein Hemmstoff der Cholinesterase oder ein Aktivator der Synthese oder Freisetzung von nicht-neuronalem Acetylcholin ist.
5. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 zur Behandlung einer Überfunktion von nicht-neuronalem Acetylcholin im Bereich der Haut, der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes.
6. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antagonist an Muskarin/Nikotinrezeptoren, ein Hemmstoff der Freisetzung von Acetylcholin und/oder ein Inhibitor der Synthese von Acetylcholin ist.
7. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein topisch wirkender Agonist an Muskarinrezeptoren ist zur Behandlung von Atemwegserkrankungen.

8. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 7 zur Behandlung oder zystischen Fibrose.
9. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein topisch wirkender Hemmstoff der Cholinesterase zur Behandlung von Atemwegserkrankungen ist.
10. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 9 zur Behandlung der zystischen Fibrose.
11. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Stimulans des epidermalen cholinergen Systems ist zur Behandlung von Hauterkrankungen.
12. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 11 zur Behandlung von Pemphigus, Wundheilungsstörungen, Haarausfall oder Störungen des Haarwuchses.
13. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Inhibitor der Cholin-Acetyl-Transferase ist zur Behandlung von Hauterkrankungen.
14. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antagonist an Muskarinrezeptoren ist zur Behandlung von Atemwegserkrankungen.
15. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 14 zur Behandlung von Asthma Bronchiale.
16. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Agonist oder Antagonist von Muskarin- oder Nikotinrezeptoren ist zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes.
17. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 16 zur Behandlung der Colitis Ulzerosa.

18. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antagonist an Muskarinrezeptoren ist zur Behandlung von Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes ist.
19. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 18 zur Behandlung der wässrigen Diarrhöe.
20. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Hemmstoff des epidermalen cholinergen Systems ist zur Behandlung von Hauterkrankungen.
21. Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antagonist an Muskarin- und/oder Nikotinrezeptoren ist zur Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen.
22. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 21 zur Behandlung der Neurodermitis, der atopischen Dermatitis oder der Kontaktdermatitis.
23. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 21 zur Behandlung der Psoriasis.
24. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 21 zur Behandlung der cholinergen Urticaria.
25. Verfahren oder Verwendung nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Aktivator der Cholin-Acetyl-Transferase ist oder die Freisetzung von Acetylcholin aus nicht-neuronalem Zellen (Gliazellen) stimuliert zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit.
26. Verfahren zur Bestimmung des Funktionszustandes von nicht-neuronalem Acetylcholin in direkten oder endoskopisch zugänglichem humanen Geweben oder Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man aus diesen Geweben eine Probe nimmt und in dieser Probe auf an sich bekannte Weise den Gehalt an Acetylcholin bestimmt.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Probennahme durch Wischen der Oberfläche mit einem Wattestäbchen erfolgt.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Probennahme mit einer angefeuchteten Watterolle erfolgt, um den Gehalt von epitheliale Acetylcholin innerhalb von Schleimhäuten des Atemtraktes, Gastrointestinaltraktes oder des Urogenitaltraktes zu bestimmen.
29. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung des Acetylcholins aus der Haut, der Mundschleimhaut und der vaginalen Schleimhaut die Cup-Technik angewandt wird.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung der Funktionalität von nicht-neuronalem Acetylcholin Stimulationslösungen eingesetzt werden.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß Lösungen von Nikotin, Zitronensäure oder  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten eingesetzt werden.